

基于氨基酸偶合显色的丝胶蛋白定量分析

但神勇, 陈维国, 郑今欢, 崔志华, 江 华

(浙江理工大学 a. “生态染整技术”教育部工程研究中心; b. “先进纺织材料与制备技术”教育部重点实验室 杭州 310018)

摘要: 为了解决在蚕丝精练实际生产中监测练减率的问题, 利用丝胶蛋白中氨基酸残基与重氮盐偶合显色的特征反应来推算练减率。文章首先绘制了氨基酸模拟丝胶蛋白偶合显色的吸光度—氨基酸浓度标准工作曲线, 并且研究了重氮盐的稳定性、偶合反应 pH 值对偶合吸光度的影响, 以及丝胶蛋白碱水解后的沉淀物成分。结果表明, 在 0 °C 时重氮盐能稳定保存, 但温度升高会导致其不稳定; 偶合反应 pH 值控制在 10 左右时, 偶合效率较高。由于精练残液碱水解后与重氮盐偶合显色推导的练减率较实际练减率低 3% ~ 4%, 丝胶蛋白碱水解沉淀物不含丝胶成分, 因此加上实验误差, 能够反映实际生产中蚕丝精练的脱胶情况。

关键词: 氨基酸; 丝胶; 重氮盐; 偶合反应; 练减率; 定量分析

中图分类号: TS143.32 文献标志码: A 文章编号: 1001-7003(2019)02-0013-06 引用页码: 021103

Quantitative analysis of sericin based on amino acid coupling coloration

DAN Shenyong, CHEN Weiguo, ZHENG Jinhuan, CUI Zhihua, JIANG Hua

(a. Engineering Research Center of “Eco-dyeing and Finishing Technology” of the Ministry of Education; b. Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Preparation Technology, Ministry of Education, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In order to realize monitoring degumming loss percentage in real production of silk refining, degumming loss percentage was reckoned based on the characteristic reaction of coupling coloration of amino acid residues in sericin with diazonium salt. In this study, the standard curve of absorbance-amino acid concentration of amino acid mimicking protein-coupled coloration was drawn first, and researches were conducted on stability of diazonium salt, effect of coupling reaction pH on coupled absorbance, and precipitation composition produced via sericin basic hydrolysis. The results show that diazonium salt can be stably stored at 0 °C, but it will become instable as the temperature rises; coupling efficiency remains high as long as coupling reaction pH is controlled around 10. The degumming loss percentage reckoned after basic hydrolysis of bast liquor and coupling coloration of diazonium salt is lower than the real value by 3% to 4%, basic hydrolysis precipitation of sericin contains no glue-like component, and there exist experimental errors. In view of this, the results can reflect degumming of silk refining in actual production reliably.

Key words: amino acid; sericin; diazonium salt; coupling reaction; degumming loss percentage; quantitative analysis

蚕丝是一种天然蛋白质纤维, 物理性能优异, 应用历史悠久, 被誉为纤维皇后。蚕丝由两根单纤维借丝胶粘合包覆而成, 外层为丝胶蛋白, 内层即为丝

素蛋白, 蚕丝脱去丝胶的过程称为精练。不同种类的蚕丝中, 丝素和丝胶蛋白的含量不尽相同, 但大体上说, 丝胶蛋白的含量一般为 20% ~ 30%^[1-2]。

蚕丝脱胶的练减率直接影响纤维的服用性能及纤维的物理性能。练减率过低, 部分丝胶还残留在丝素上, 蚕丝手感僵硬、泛黄; 练减率过高, 丝胶全部除去, 还有部分丝素被溶落, 造成蚕丝损伤, 强度下降。如何控制蚕丝练减率来保证练白丝绸的质量, 一直以来都是蚕丝精练生产的重点和难点, 目前工

收稿日期: 2018-06-13; 修回日期: 2018-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(51673176); 浙江省自然科学基金项目(LY16B060006)

作者简介: 但神勇(1994—) 男, 硕士研究生, 研究方向为新型染整化学品。通信作者: 陈维国 教授, wgcchen62@126.com。

厂生产中都是凭借经验来制定生产工艺,控制丝绸的练减率。但是,不同品种的蚕丝其丝胶含量有一定的差异,即使是同样品种的蚕丝,当制造不同紧密程度、不同织物结构的丝绸产品时,温度、时间等工艺参数对练减率的高低都有影响,凭借经验往往难以控制好练减率。所以,对蚕丝精练过程进行监控,可有效地提高产品的质量。

Sluyterman L A^[3]、Sengupta S 等^[4]研究了酪氨

酸、组氨酸与 Pauly 试剂生成有色化合物的机理。为此,本文研究了酪氨酸、组氨酸、色氨酸与重氮苯磺酸盐偶合显色反应^[5-9],通过测试吸光度,绘制标准工作曲线,然后对精练中脱落下来的丝胶蛋白进行偶合反应,测试其吸光度,利用氨基酸偶合标准曲线,反向推算出练液中丝胶蛋白含量,进而计算出练减率。本文为工厂实际生产提出了一种实时监测蚕丝练减率的便捷方法,氨基酸偶合反应机理如图1所示。

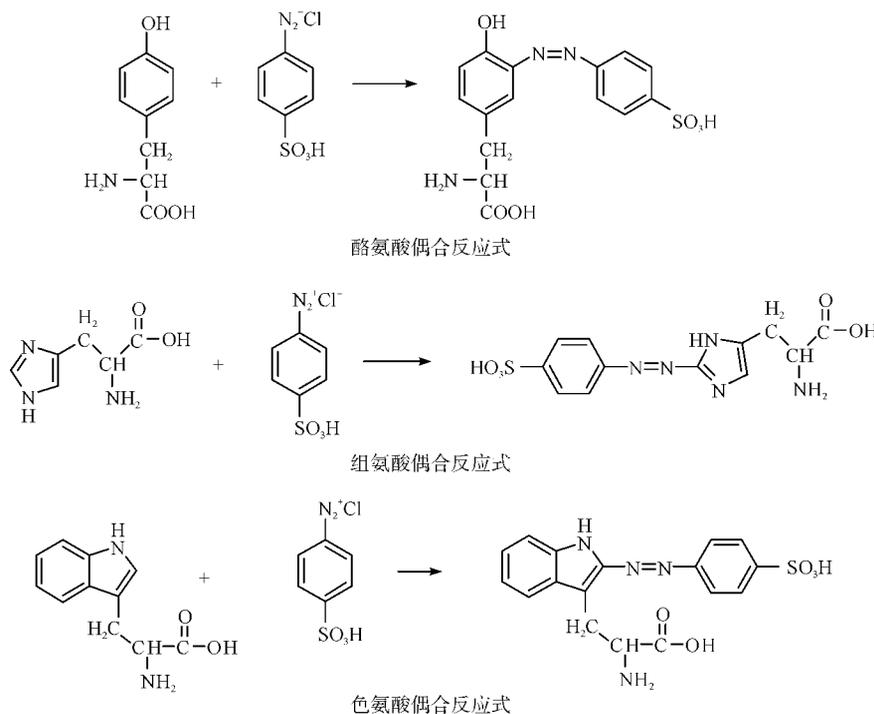


图1 氨基酸偶合反应式

Fig. 1 Amino acid coupling reaction formula

1 实验

1.1 材料及仪器

材料: 11160 蚕丝电力纺生坯布(浙江同辉纺织有限公司)、精练剂(工业级)、纯碱(工业级)、泡花碱(工业级)、保险粉(工业级)、氢氧化钠(AR)(天津市永大化学试剂有限公司)、浓盐酸(上海三鹰化学试剂有限公司)、尿素(AR)(无锡市展望化工试剂有限公司)、亚硝酸钠(AR)、对氨基苯磺酸(AR)、色氨酸(AR)、组氨酸(AR)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、酪氨酸(AR)(上海萨恩化学技术有限公司)。

仪器: 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)、VARIO MICRO cube 有机元素分析仪(德国 Elements 公司)、扫描电镜-能谱仪(英国牛津仪器公司)、PHS-3C 精密台式 pH 计(杭州奥立龙仪器有限公司)、DF-401S 集热式恒温加热磁力搅拌

器(杭州惠创仪器设备有限公司)、分析天平(北京赛多利斯天平有限公司)、DHG-9076A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 重氮盐的制备

分别取 3.20×10^{-5} 、 4.27×10^{-5} 、 5.34×10^{-5} 、 6.41×10^{-5} 、 7.48×10^{-5} 、 8.55×10^{-5} mol 的对氨基苯磺酸至小烧杯中,各加入对氨基苯磺酸 1.5 倍量的盐酸,在冰浴条件下,再加入对氨基苯磺酸 1.2 倍量的亚硝酸钠,反应 30 min,然后用淀粉碘化钾试纸检测亚硝酸是否过量,如果试纸取出 3 s 内变蓝,则需加入尿素除去过量的亚硝酸钠。

1.2.2 重氮盐稳定性实验

将制备好的重氮盐分别放置于 0 °C 和 20 °C 下 0、1、2、4、12 h; 取出与氨基酸偶合反应,测其吸光度。

1.2.3 偶合过程 pH 值对吸光度的影响实验

调节偶合反应 pH 值,依次为 8、9、9.5、10、10.5、11、12;反应完全后测其吸光度。

1.2.4 氨基酸模拟丝胶蛋白偶合显色实验

分别对三种氨基酸进行偶合实验,并用紫外-可见光谱测试分析。参照丝胶中三种氨基酸的质量比(酪氨酸:组氨酸:色氨酸=9.8:2.8:1)配制 6 组氨基酸混合物,如表 1 所示。

表 1 三种氨基酸混合物的比例组成

Tab. 1 Proportion of composition of three amino acid mixtures

组号	酪氨酸/ ($\times 10^{-5}$ mol)	组氨酸/ ($\times 10^{-5}$ mol)	色氨酸/ ($\times 10^{-5}$ mol)
1	1.500 0	0.500 4	0.135 8
2	2.000 0	0.667 2	0.181 1
3	2.500 0	0.834 1	0.226 3
4	3.000 0	1.000 9	0.271 6
5	3.500 0	1.167 7	0.316 8
6	4.000 0	1.334 5	0.362 1

偶合显色反应:将配好的氨基酸溶液置于冰浴条件下,然后将制备好的重氮盐逐滴加入氨基酸溶液中,调节 pH 值至 10,反应 20 min;取相同体积的偶合溶液,测试吸光度,并绘制标准工作曲线。

1.2.5 蚕丝脱胶实验

参照工厂蚕丝精练工艺进行脱胶实验,具体工艺如表 2 所示。

表 2 蚕丝精练工艺

Tab. 2 Silk refining process

名称	浴比	温度/ ℃	时间/ min	精练剂/ ($g \cdot L^{-1}$)	纯碱/ ($g \cdot L^{-1}$)	泡花碱/ ($g \cdot L^{-1}$)	保险粉/ ($g \cdot L^{-1}$)
初练	1:68	98	70	5.00	0.76	0.66	0.16
复练	1:68	98	30	2.00	0.50	0.33	0.16

取干质量为 1 g 左右的蚕丝生坯布,按照表 2 精练工艺进行脱胶,计算实际练减率,收集精练残液,加入 6 mol/L 的 NaOH,在 100 °C 下水解 4 h,重复实验 3 次。

1.2.6 精练液丝胶蛋白重氮偶合实验

将水解后的丝胶液与重氮盐进行偶合反应,测试偶合溶液吸光度;根据上述标准工作曲线推算氨基酸含量,进而计算丝胶蛋白含量,得出推导练减率。

1.2.7 丝胶液水解沉淀物分析实验

在精练残液中加入 NaOH,配成浓度为 6 mol/L 的 NaOH 溶液,在 100 °C 下水解 4 h,然后将溶液与沉淀物离心分离,收集沉淀物,重复水洗离心 6 次以除去里面的盐分,烘干后称重。采用 VARIO MICRO

cube 有机元素分析仪(N、C、H、S 模式)及扫描电镜-能谱仪对沉淀物进行测试,测试 3 次,取其平均值。

2 结果与分析

2.1 重氮盐稳定性分析

重氮盐不稳定,容易放出氮气而分解,对存放条件要求较苛刻。为此,利用重氮盐与酪氨酸偶合反应后的吸光度为衡量指标,对重氮盐存放温度、时间进行测试,结果如图 2 所示。

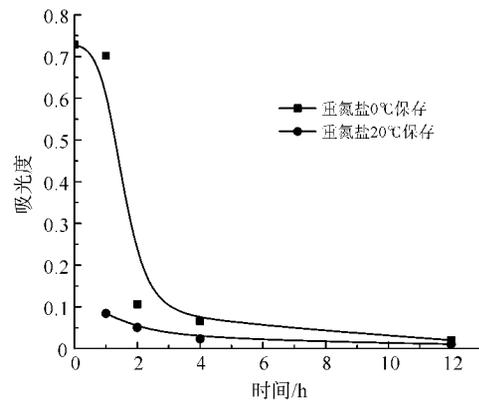


图 2 重氮盐存放温度、时间对偶合反应吸光度的影响

Fig. 2 Effect of storage temperature and time of diazonium salt on absorbance of coupling reaction

从图 2 可以看出,制备好的重氮盐在 0 °C 条件下保存 1 h 后,吸光度急剧下降;2 h 后,吸光度基本为零;重氮盐在 20 °C 条件下放置 1 h 后,其吸光度接近零。这表明重氮盐在 0 °C 条件下,仅能保存 1 h 左右,时间过长,重氮盐很快分解,不能进行偶合反应;在 20 °C 条件下,重氮盐很快分解,不便保存;升高温度有利于偶合反应进行,但重氮盐同样容易分解。所以重氮盐应现配现用,以防分解;偶合反应温度也应在低温条件下进行^[10-11]。

2.2 偶合过程 pH 值对偶合反应吸光度的影响

重氮盐与氨基酸偶合反应对 pH 值比较敏感,过酸或者过碱性对偶合过程都有较大影响,合适的 pH 值对偶合反应及吸光度的影响尤为重要。

将配制好的重氮盐与酪氨酸在不同 pH 值下进行偶合反应(图 3)。由图 3 可知,偶合 pH 值为 8 ~ 10 时,吸光度随着偶合 pH 值增大而逐渐增大;pH 值为 10 ~ 12 时,吸光度随着偶合 pH 值增大而快速下降。这是因为在弱碱性条件下,酚羟基容易解离为 ArO^- ,它比酚羟基更容易进行亲电取代反应。pH 值太高,重氮盐会转化为不活泼的重氮酸盐而难以发生偶合反应;pH 值太低,芳胺离子不易水解成芳胺

而失去对芳环的亲电取代能力。综上可知,当 pH 值为 10 的时候,更有利于偶合反应^[12]。

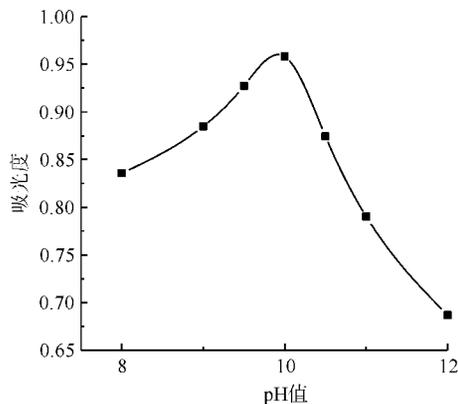


图3 pH 值对偶合反应吸光度的影响

Fig. 3 Effect of pH on absorbance of coupling reaction

2.3 氨基酸模拟丝胶蛋白偶合显色标准曲线

经大量筛选,发现只有酪氨酸、组氨酸、色氨酸可与重氮盐进行偶合反应,单品酪氨酸、组氨酸、色氨酸与重氮盐偶合反应紫外-可见光谱如图 4 所示。由三种氨基酸混合与制备好的重氮盐进行偶合反应,偶合产物紫外可见光吸收光谱如图 5 所示。

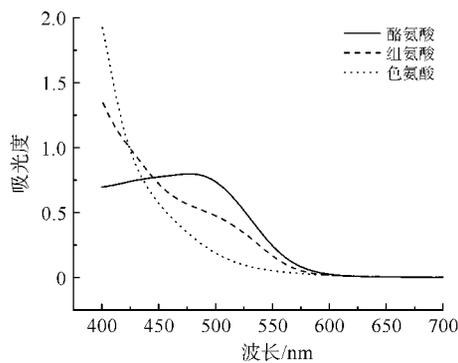


图4 三种氨基酸与重氮盐偶合紫外-可见光光谱

Fig. 4 Coupling UV-Vis spectra of three amino acids with diazonium salt

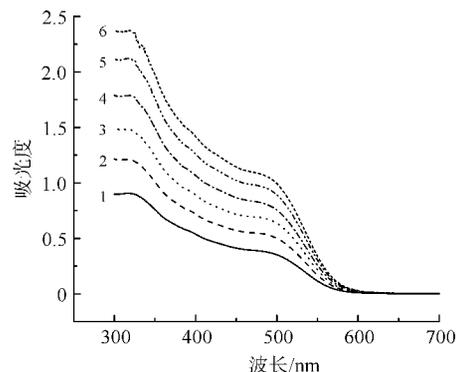


图5 氨基酸组合模拟丝胶蛋白偶合产物紫外-可见光光谱

Fig. 5 UV-Vis spectroscopy of products of amino acid combination simulating sericin coupling

由图 4 可以看出,酪氨酸偶合产物在 478 nm 处有吸收峰,组氨酸、色氨酸在可见光区没有明显吸收峰。在丝胶蛋白中,组氨酸、色氨酸含量较少,而酪氨酸含量相对较高,在丝胶蛋白中约为 5%。由图 5 可知,吸光度随着氨基酸浓度的增加而逐渐增大,曲线在 478 nm 处有吸收峰,从而选取 478 nm 处吸光度值绘制标准工作曲线,如图 6 所示。

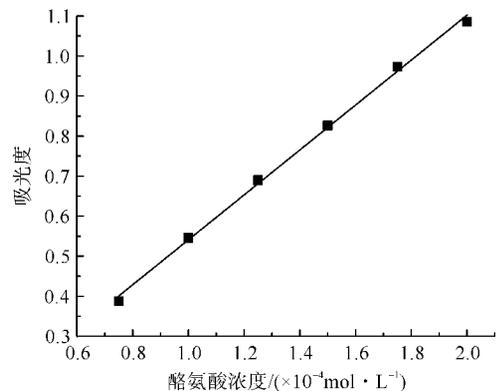


图6 氨基酸组合模拟丝胶蛋白偶合显色标准曲线

Fig. 6 Coupling coloration standard curve of amino acid combination simulating sericin protein

由图 6 可得线性方程为: $A = 0.56108C - 0.02022$, 式中 A 表示吸光度值; C 表示酪氨酸浓度。线性因子为 0.99745, 线性关系良好。

2.4 精练液丝胶蛋白偶合显色性能

精练液丝胶蛋白偶合吸光度曲线如图 7 所示。

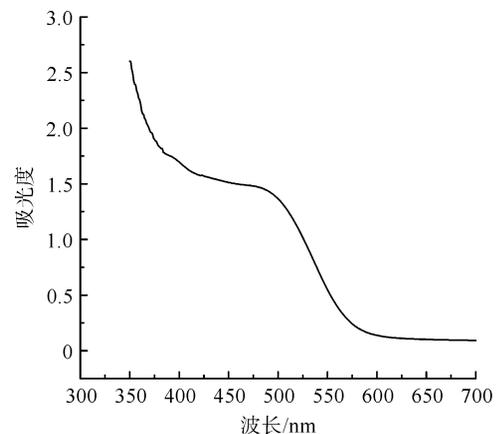


图7 精练液丝胶蛋白偶合可见光光谱

Fig. 7 Spectrograph of coupled visible light of refined liquid sericin protein

对比图 6、图 7 可知,丝胶蛋白偶合光谱曲线在可见光区与氨基酸偶合光谱曲线基本一致,在 478 nm 处皆有波峰出现,因此氨基酸模拟丝胶蛋白偶合曲线是可行的。

蚕丝丝胶含量因不同种类蚕丝而不同,如表 3

所示,实际练减率为 23% 左右,根据偶合标准曲线推导的练减率为 20% 左右,丝胶蛋白水解液偶合推导练减率相比实际练减率存在 3% ~ 4% 的差。实验过程中发现丝胶蛋白水解后有少量沉淀物产生,该沉淀杂质可能不参与反应,减少了推导练减率的值。所以,有必要进一步对丝胶水解沉淀物进行分析。

表 3 由碱水解精练液偶合显色推导的蚕丝练减率

Tab.3 Silk degumming loss percentage calculated based on coupling coloration of alkali-hydrolyzing refiner

蚕丝质量/g	蚕丝脱胶后质量/g	实际练减率/%	推导练减率/%	练减率差值/%
0.547 0	0.417 6	23.650 0	19.830 0	3.820 0
0.963 0	0.737 7	23.390 0	19.760 0	3.630 0
1.028 0	0.799 0	22.280 0	18.840 0	3.440 0

2.5 丝胶水解液沉淀物分析

对丝胶水解沉淀物进行水洗离心分离收集,平行三次实验,如表 4 所示;然后对沉淀物进行有机元素分析,结果如表 5 所示。

表 4 水解沉淀物含量分析

Tab.4 Hydrolysis sediment content analysis

蚕丝质量/g	沉淀质量/g	沉淀含量/%
1.006 5	0.034 2	3.390 0
1.017 2	0.035 3	3.470 0
0.987 3	0.032 5	3.290 0

表 5 有机元素分析

Tab.5 Analysis of organic elements

元素	含量/%
N	0.14
C	1.52
H	1.78
S	0.00

由表 4 可以算出,三次沉淀平均含量为 3.38%,但并不能确定沉淀是否是丝胶溶落物,因此对其沉淀物进行有机元素分析。由表 5 分析结果看出,N、C、H 的质量百分含量都较低,并不是氨基酸的元素含量,杂质里面可能还有少量的氨基酸未分离出来,以及样品还残留少量的水分,导致还能检测出少量的 N、C、H。为了进一步分析沉淀物成分,对其进行了 EDS 测试,结果如图 8 所示。

由图 8 可知,该沉淀物主要成分是 Si、O,并含有少量的 C、Na、Al 等。由此分析认为,沉淀物主要是一些含硅的复杂化合物,这可能对丝胶蛋白水解液偶合推导练减率结果产生了影响,导致推导练减率的下降。根据表 2 可知精练过程中 1 g 蚕丝生坯布

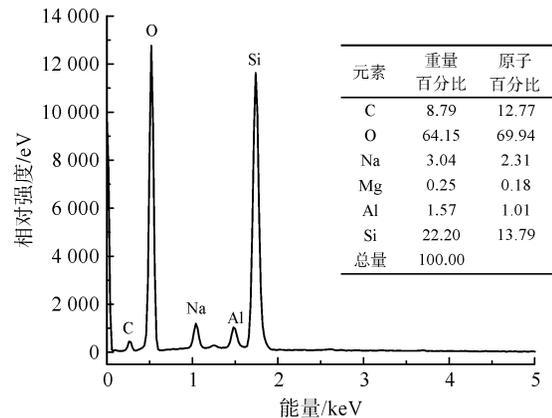


图 8 沉淀物 EDS 测试结果

Fig.8 Sediment EDS text results

约加入 0.044 g 泡花碱,泡花碱及精练剂在强碱高温的作用下可能会形成复杂硅胶沉淀,而收集的沉淀物为 0.034 g,这与加入的泡花碱有一定差值,反之前面推导练减率加上该沉淀物含量则与实际练减率基本对应。但该沉淀物可能并不是丝胶溶落物,推导练减率相比实际练减率低则是由于丝胶蛋白偶合反应率较低,而氨基酸偶合反应率较高,这也会对推导练减率造成影响。该沉淀物结构及来源还尚不明确,是否是泡花碱等形成的复杂硅胶也还需进一步深入研究。

3 结论

本文借助氨基酸重氮偶合显色特征反应,绘制标准工作曲线,通过对精练液丝胶蛋白水解氨基酸的测试,利用方程 $A = 0.56108C - 0.02022$ 反向间接地推算出精练液中多肽蛋白的含量,为实际生产提供了一种监测蚕丝练减率的简便方法。

研究表明,重氮苯磺酸盐非常容易分解,应在 0 °C 条件下配制并及时使用;调控 pH 值为 10 时,偶合效率最高,吸光度最大;氨基酸组合模拟丝胶蛋白偶合显色标准曲线线性关系良好,通过实验结果计算推导出练减率为 20% 左右,实际练减率则约为 23%,而精练下来的丝胶蛋白水解过程产生含量 3.38% 的沉淀物。测试推导出的练减率加上沉淀物含量能较好地对应实际精练脱胶,可以反映蚕丝精练过程的实际脱胶情况。精练液水解产生的沉淀物成分从有机元素分析和 EDS 结果来看可能是一些含硅复杂化合物,可能是泡花碱等形成的复杂硅胶,也可能是泡花碱吸附了丝胶蛋白大分子形成的沉淀物,但其形成原因及具体结构还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1]孙彩娥,李肖舟,曹锦如.不同蚕品种茧层丝胶含量的调查[J].蚕桑通报,1992,23(3):47-49.
SUN Caie, LI Xiaozhou, CAO Jinru. Investigation on the content of sericin in different silkworm varieties [J]. Bulletin of Sericulture, 1992, 23(3): 47-49.
- [2]李绍峰,虞晓华.桑蚕雌雄蚕丝氨基酸成分分析[J].江苏蚕业,2012,34(2):12-15.
LI Shaofeng, YU Xiaohua. Analysis of amino acid composition of silkworm male silkworm [J]. Jiangsu Sericulture, 2012, 34(2): 12-15.
- [3]SLUYTERMAN L A. The effect of oxygen upon the micro determination of histidine with the aid of the pauly reaction [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1960, 38(2): 218-221.
- [4]SENGUPTA S, BHATTACHARYYA S. Aqueous heck reaction of amino acid derived arenediazonium salts: semisynthetic modification of phenylalanine and tyrosine [J]. Tetrahedron Letters, 1995, 36(25): 4475-4478.
- [5]郭旭,翁连进,甘林火,等. Pauly 试剂显色测定 L-酪氨酸的研究[J]. 化工科技, 2006, 14(5): 4-7.
GUO Xu, WENG Lianjin, GAN Linhuo, et al. Study on determination of the L-tyrosine with pauly reagent [J]. Science & Technology in Chemical Industry, 2006, 14(5): 4-7.
- [6]郑今欢,邵建中,刘今强. 蚕丝丝素蛋白中酪氨酸分布的初探[J]. 纺织学报, 2001, 22(6): 2, 7-9.
ZHENG Jinhuan, SHAO Jianzhong, LIU Jinqiang. Studies on the distribution of tyrosine in silk fibroin [J]. Journal of Textile Research, 2001, 22(6): 2, 7-9.
- [7]林宇燕. 组氨酸测定方法的建立[J]. 职业与健康, 2008, 24(8): 734-736.
LIN Yuyan. Establishment of a method for histidine determination [J]. Occupation and Health, 2008, 24(8): 734-736.
- [8]何俊锋,张伟国. 发酵液中 L-组氨酸的定性定量测定[J]. 食品与生物技术学报, 2006(4): 56-58, 112.
HE Junfeng, ZHANG Weiguo. Quantitative and qualitative determination of L-histidine in fermentation broth [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006(4): 56-58, 112.
- [9]郑今欢,周岚,邵建中. 蚕丝丝素中色氨酸含量及其在丝素纤维中的径向分布研究[J]. 高分子学报, 2005(2): 161-166.
ZHENG Jinhuan, ZHOU Lan, SHAO Jianzhong. Studies on content and distribution of tryptophan in silk fiber [J]. Acta Polymerica Sinica, 2005(2): 161-166.
- [10]何铠君,王宗乾,陈维国,等. 三氟乙酸法制备邻硝基苯胺重氮盐及其稳定性分析[J]. 浙江理工大学学报, 2015, 33(1): 16-19.
HE Kaijun, WANG Zongqian, CHEN Weiguo, et al. Preparation of O-nitroaniline diazonium salt with trifluoroacetic acid and its stability analysis [J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2015, 33(1): 16-19.
- [11]苏彦雷,刘建芳,林克江,等. 量子化学计算法对合成中 4 个芳香重氮盐稳定性的分析[J]. 海峡药学, 2013, 25(8): 186-188.
SU Yanlei, LIU Jianfang, LIN Kejiang, et al. The analysis of stability of four aromatic diazonium salts in synthetic process with Quantum chemistry calculation method [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2013, 25(8): 186-188.
- [12]叶曦雯,李引,牛增元,等. 23 种致癌芳香胺的显色法测定[J]. 纺织学报, 2012, 33(12): 58-63.
YE Xiwen, LI Yin, NIU Zengyuan, et al. Chromogenic method determination of 23 kinds of carcinogenic aromatic amines [J]. Journal of Textile Research, 2012, 33(12): 58-63.